

Aplysia kurodai cyclic ADP-ribose 合成酵素遺伝子の構造と発現

著者	杉本 孝子
号	1268
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/21107

氏 名（本籍）	すぎもと たかこ 杉 本 孝 子
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 6 8 号
学位授与年月日	平 成 7 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）病態科学系専攻
学 位 論 文 題 目	The Gene Structure of the <i>Aplysia kurodai</i> ADP-Ribosyl Cyclase, a Second Messenger Enzyme. (<i>Aplysia kurodai</i> cyclic ADP-ribose 合成酵素 遺伝子の構造と発現)
論文審査委員	(主 査) 教授 岡 本 宏 教授 柴 原 茂 樹 教授 田 村 眞 理

論文内容要旨

【はじめに】

cyclic ADP-ribose (cADPR) はウニの小胞体からの Ca^{2+} 放出を誘導する物質として発見された環状のヌクレオチドで、cADPR 合成酵素 (ADP-ribosyl cyclase) により NAD から合成される。cADPR は、豚ランゲルハンス島 β 細胞でグルコース刺激によるインスリン分泌のセカンドメッセンジャーとして働いている他、ヒトの気道腺細胞やウシガエルの交感神経細胞においても細胞内情報伝達物質として機能していることが報告されている。本研究ではこの新しい細胞内情報伝達物質 cADPR の合成酵素である ADP-ribosyl cyclase の遺伝子構造を決定した。

【研究内容】

- 1) ADP-ribosyl cyclase の cDNA の構造は、アメリカ沿岸で一般的なアメフラシ, *Aplysia californica* で報告されている。そこでこの cDNA の塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、日本沿岸で一般的なアメフラシ, *A. kurodai* の卵精巢から抽出した RNA を鋳型に RT-PCR 法により ADP-ribosyl cyclase の cDNA 断片を増幅した。この cDNA 断片をプローブとして、*A. kurodai* の卵精巢の cDNA ライブラリーから ADP-ribosyl cyclase の cDNA を単離し、その塩基配列を決定した。また、cDNA の 5' 端の塩基配列は、5' RACE 法により決定した。*A. kurodai* の ADP-ribosyl cyclase cDNA は poly (A) tract を除くと全長 1687bp で、282 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていた。アミノ酸配列の 1 番目から 24 番目までは疎水性アミノ酸に富んでおりシグナルペプチドの領域と考えられた。この 24 アミノ酸を除いた酵素本体の分子量は 29,474 と推定され、精製酵素の SDS ゲル電気泳動での分子量 29kDa とほぼ一致した。
- 2) 本研究で単離した *A. kurodai* の ADP-ribosyl cyclase cDNA をプローブに *A. kurodai* の種々の組織から抽出した RNA に対してノーザンブロット分析を行った。その結果、*A. kurodai* の ADP-ribosyl cyclase の mRNA は卵精巢でのみ大量に発現していた。
- 3) *A. kurodai* の ADP-ribosyl cyclase cDNA をプローブに *A. kurodai* の genomic DNA に対してサザンブロット分析を行った結果、用いた制限酵素のすべてにおいて単一のバンドが認められたことから、*A. kurodai* の ADP-ribosyl cyclase 遺伝子はハプロイドあたり単一コピーであると推定された。
- 4) *A. kurodai* の genomic DNA より遺伝子ライブラリーを作製して、今回単離した *A. kurodai* ADP-ribosyl cyclase の cDNA をプローブに ADP-ribosyl cyclase の遺伝子を単離し、全塩基配列を決定した。*A. kurodai* の ADP-ribosyl cyclase 遺伝子は全長 7kbp で 8 個のエ

クソンと7個のイントロンより構成されており、エクソン・イントロンの境界はすべて GT-AG ルールを満たしていた。エクソン1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 の長さはそれぞれ 51, 160, 133, 219, 80, 90, 87, 868bp であった。エクソン1 は mRNA の 5' 非翻訳領域を、エクソン2 はシグナルペプチドと酵素本体の一部をコードしていた。また酵素本体をコードしている領域はエクソン2 から8 までに細かく分割されていた。

5) *A. kurodai* ADP-ribosyl cyclase 遺伝子の転写開始点はプライマー伸長法と S1 スクレアーゼマッピング法によって決定した。転写開始点の上流 28bp のところに TATA box が認められた。転写開始点の上流 1649bp, 1161bp, 234bp に、マウスの sperm receptor である ZP3 遺伝子の oocyte specific な発現をコントロールしている転写因子 OSP-1 の結合配列が認められた。また上流 90bp には *Drosophila* の卵殻を構成する蛋白質の組織特異的発現をコントロールしている chorion box sequence の共通配列が認められた。*A. kurodai* ADP-ribosyl cyclase 遺伝子の卵精巣での特異的な発現にこれらの転写調節配列と転写因子が関与している可能性が考えられた。

【ま と め】

cADPR は近年その生理的意義が明らかにされつつある新しい細胞内情報伝達物質であるが、その代謝酵素の遺伝子構造は全く不明であった。本研究により、cADPR 合成酵素 (ADP-ribosyl cyclase) の遺伝子の全構造が初めて明らかとなった。

審 査 結 果 の 要 旨

細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は最も基本的かつ重要な生命現象である。細胞内プールからの Ca^{2+} 動員を引き起こす物質としては従来、イノシトール 1, 4, 5 三リン酸 (IP_3) が知られていた。cyclic ADP-ribose (cADPR) は 1987 年米国の Lee らによってウニの小胞体からの Ca^{2+} 放出を誘導する物質として発見された環状のヌクレオチドで、cADPR 合成酵素 (ADP-ribosyl cyclase) により NAD から合成される。最近になり、cADPR は豚ランゲルハンス島 β 細胞でグルコース刺激によるインスリン分泌のセカンドメッセンジャーとして働いている他、ヒトの気道腺細胞やウシガエルの交感神経細胞においても細胞内情報伝達物質として機能していることが報告され、cADPR を介する新しい情報伝達系の解明は医学・生物学上の重要課題となってきた。本研究で、著者は cADPR 合成酵素である ADP-ribosyl cyclase の遺伝子構造を初めて明らかにした。

著者は、研究開始時に唯一 cADPR 合成活性の存在が明らかであったアメフラシ (*Aplysia kurodai*) 卵精巣の cDNA ライブラリーから ADP-ribosyl cyclase cDNA を単離し、その塩基配列を決定した。*A. kurodai* の ADP-ribosyl cyclase cDNA は poly (A) tract を除くと全長 1687bp で、282 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていた。アミノ酸配列の 1 番目から 24 番目までは疎水性アミノ酸に富んでおりシグナルペプチドの領域と考えられた。この 24 アミノ酸を除いた酵素本体の分子量は 29,474 と推定され、精製酵素の SDS ゲル電気泳動での分子量 29kDa とほぼ一致した。

次に、単離した *A. kurodai* ADP-ribosyl cyclase の cDNA をプローブに ADP-ribosyl cyclase の遺伝子を *A. kurodai* 遺伝子ライブラリーより単離し、全塩基配列を決定した。*A. kurodai* ADP-ribosyl cyclase 遺伝子は全長 7kbp で 8 個のエクソンと 7 個のイントロンより構成されており、エクソン・イントロンの境界はすべて GT-AG ルールを満たしていた。エクソン 1 は mRNA の 5' 非翻訳領域を、エクソン 2 はシグナルペプチドと酵素本体の一部をコードしていた。また酵素本体をコードしている領域はエクソン 2 から 8 までに分割されていた。遺伝子の上流域に関しては、転写開始点の上流 28bp のところに TATA box が、上流 1649bp, 1161bp, 234bp に、マウスの sperm receptor である ZP3 遺伝子の oocyte specific な発現をコントロールしている転写因子 OSP-1 の結合配列が認められた。また上流 90bp には *Drosophila* の卵殻を構成する蛋白質の組織特異的発現をコントロールしている chorion box sequence の共通配列が認められた。ノーザンブロット分析を行った結果、*A. kurodai* の ADP-ribosyl cyclase の mRNA は卵精巣でのみ大量に発現していたが、この ADP-ribosyl cyclase 遺伝子の卵精巣で特異的な発現にこれらの転写調節配列と転写因子が関与している可能性が考えられた。

このように本研究により、cADPR 合成酵素 (ADP-ribosyl cyclase) の遺伝子の全構造が初めて明らかとなった。従って本論文は学位論文に値するのみならず、医学・生物学における意義・価値はきわめて大きいものである。